

Behandling med stamceller vid osteoartrit hos häst

Stem cell therapy for treatment of osteoarthritis in the horse

Amanda Eklund



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp
Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsvetenskap
Uppsala 2016

Behandling med stamceller vid osteoartrit hos häst

Stem cell therapy for treatment of osteoarthritis in the horse

Amanda Eklund

Handledare: Eva Skiöldebrand, Sektionen för patologi, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

Examinator: Eva Tyden, Avdelningen för parasitologi och virologi, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2016

Omslagsbild: Navaz Sumar

Serietitel, nr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Del nummer i serien: 2016:2

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: osteoartrit, ledsjukdom, stamceller, cellterapi, häst

Key words: osteoarthritis, joint disease, stem cells, cell therapy, horse

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
ABSTRACT	2
INLEDNING	3
MATERIAL OCH METODER	3
LITTERATURÖVERSIKT	4
SYNOVIALLEDEN	4
<i>Funktion</i>	4
<i>Anatomi</i>	4
Ledkapsel	4
<i>Ledvätska</i>	5
Ledbrosk	5
<i>Kondrocyter</i>	5
<i>Extracellulärt matrix</i>	6
Subkondralt ben	8
Senor och ligament	8
OSTEOARTRIT	8
<i>Etiologi</i>	8
<i>Patogenes</i>	9
Inflammation	9
<i>Interleukin-1</i>	9
<i>PGE₂</i>	9
<i>MMPs</i>	10
<i>ADAMTs</i>	10
<i>Fria radikaler</i>	10
Tillväxtfaktorer	10
<i>Kliniska och histologiska fynd</i>	11
BEHANDLING MED STAMCELLER	12
<i>Mesenkymala stamceller</i>	12
Potentialen hos MSCs	12
Antiinflammatoriska egenskaper	12
Utvinning av MSCs	12
Differentiering och adhesion	13
<i>Studier med MSC</i>	13
Experimentella studier	13
<i>Studier med andra modelldjur</i>	14
Kliniska försök	15
DISKUSSION	16
REFERENSLISTA	17

SAMMANFATTNING

Synovialleden är uppbyggd av hyalint brosk, subkondralt ben, ledkapsel med ledvätska samt senor och ligament. Hästens leder utsätts för stora påfrestningar vid arbete och det krävs att alla vävnaderna i leden samarbetar för att upprätthålla ledens funktion. Ledens uppgift är att fördela belastningen över hela ledens yta vid rörelse. Ledbrosket består av kondrocyter och extracellulärt matrix. Matrixet består till största delen av vatten, kollagen och proteoglykaner. Kollagenet bildar ett nätverk som ger leden en hög draghållfasthet. Mellan kollagenfibrillerna ligger proteoglykanaggregaten insprängda. Glykosaminoglykaner (GAGs) sitter bundna till proteinkedjan av molekylen. Dessa är negativt laddade och binder vatten, vilket ger leden en stötdämpande förmåga. Den vanligaste proteoglykanen i brosk är aggrecan vilken ute i matrixet är bunden till hyaluronsyra. Det subkondrala benet kan i viss utsträckning anpassa sig till den belastning som det utsätts för. Vid hårt arbete kan benet förtjockas och skleros kan ses på röntgen. Ledkapseln byggs upp av två lager – en yttre fibrös kapsel som ger mekanisk stabilitet samt ett inre synovialmembran innehållande synoviocyter, vilka producerar hyaluronsyra till ledvätskan. Ledvätskan är ett ultrafiltrat av blodet och innehåller stora mängder högmolekylär hyaluronsyra i en frisk led. Ledvätskan förser även brosket med näring.

Osteoartrit (OA) är en lågradig inflammatorisk sjukdom där ledens alla vävnader kan vara involverade. Den vanligaste orsaken till uppkomst av OA är felbelastning av leden under en längre tid, exempelvis vid träning. Hos en frisk led råder en balans mellan uppbyggande och nedbrytande processer i brosket. Vid en kronisk inflammation i leden ökar de katabola aktiviteterna. Broskhål kan ses makroskopiskt då de ingående matrixmolekylerna bryts ned. Ofta initieras OA av en synovit eller en kapsulit. Vid inflammationen frisätts proinflammatoriska cytokiner och mediatorer från synoviocyter och kondrocyter. IL-1 stimulerar de katabola enzymerna MMPs och ADAMTs, vilka bryter ned matrixkomponenter. I och med att broskmatrixet bryts ned blir leden mindre flexibel och tånjbar. Nya skador uppstår lättare då brosket har en nedsatt elasticitet på grund av degenereringen.

Mesenkymala stamceller (MSCs) är celler som kan differentiera ut till ben-, brosk-, sen- och fettceller vid rätt odlingsbetingelser eller vid olika omgivningsbetingelser i vävnaden. Intresset för stamcellsterapi har ökat kraftigt den senaste tiden på grund av stamcellernas tilltro att regenerera vävnad. Ledbrosket har hos en vuxen häst dålig regenerationsförmåga. Förhoppningen är därför att MSCs ska kunna användas rutinmässigt för att återbilda skadat brosk och återställa ledens ursprungliga funktion. Ett antal experimentella och kliniska studier har genomförts på häst, både med inducerad och med naturligt uppkommen OA. Vid behandling med MSCs har kliniska förbättringar, som minskad hälta och svullnad setts, och en stor andel av de behandlade hästarna har återgått till arbete. Resultaten är lovande och MSCs har stor potential som terapiform vid OA på häst i framtiden. Dock är antalet publicerade studier få och många av studierna saknar kontrollgrupper. Syftet med detta arbete är att studera de vetenskapliga studier som finns publicerade inom området, samt att beskriva synovialledens anatomi och patofysiologin bakom OA.

ABSTRACT

The synovial joint consists of hyaline cartilage, subchondral bone, joint capsule with synovial fluid, tendons and ligaments. The horse's joints are exposed to great stress during training and it is required by all of the joint's components to cooperate in order to maintain joint function. The function is to distribute the load over the entire surface of the joint during movement. The articular cartilage consists of chondrocytes and extracellular matrix (ECM). The matrix is mainly composed of water, collagen and proteoglycans. The collagen forms a network that provides the joint with a high tensile strength. Between the collagen fibrils, proteoglycans are embedded and glycosaminoglycans (GAGs) are bound to the protein chain molecule. GAGs are negatively charged and attract water. The water is pressed out under load, which gives the joint a shock absorbing capacity. The most common proteoglycan in cartilage is aggrecan which is bound to hyaluronic acid in the matrix. The subchondral bone can to some extent adapt to the loads it is subjected to. Training results in thickening of the bone and sclerosis can be seen on x-ray. The joint capsule is built up of two layers - an outer fibrous capsule which provides mechanical stability and an inner synovial membrane containing synoviocytes responsible for producing the hyaluronic acid found in the synovial fluid. The synovial fluid is an ultrafiltrate of blood and contains large amounts of high molecular weight hyaluronic acid in a healthy joint. The synovial fluid supplies the cartilage with nutrients.

Osteoarthritis (OA) is a low-grade inflammatory disease of the joint in which all structures can be involved. The most common cause of OA is overload of the joint over a period of time, training for example. In a healthy joint there is a balance between anabolic and catabolic processes. In OA, these processes are in imbalance and the catabolic activity increases which results in breakdown of the ECM constituent seen as cartilage erosions macroscopically. OA is often initiated by synovitis or capsulitis. In the inflammation, proinflammatory cytokines and mediators are released by synoviocytes and chondrocytes. IL-1 stimulates the degrading enzymes MMPs and ADAMTs, which degrade matrix components. When the cartilage matrix is degraded, the joint becomes less flexible and elastic. New injuries occur more easily when the cartilage has a reduced elasticity due to the degeneration.

Mesenchymal stem cells (MSCs) have the capacity to differentiate into a variety of connective tissue cells including bone, cartilage, tendon, muscle and adipose tissue at the right culture conditions or at different conditions in the surroundings of the tissue. The interest in stem cells as therapy has evolved rapidly, due to their regenerating capacity. Joint cartilage in an adult horse has poor regenerating capacity. The hope is therefore to use MSCs routinely to regenerate damaged cartilage and restore joint's original function. A number of experimental and clinical studies have been conducted on horses, both with induced and natural arising OA. When treated with MSCs, clinical improvements, as reduced lameness and swelling, were seen. A large percentage of the treated horses did return to work. MSCs have a promising potential to serve as therapy for OA in the future. However, there are still very few studies published in the field and many of the trials lack control groups. The aim of this paper is to review the scientific studies that are published in the field, describe the anatomy of the synovial joint and the pathophysiology behind OA.

INLEDNING

Osteoartrit (OA) är en vanlig ledsjukdom och ett signifikant problem hos hästar på grund av den höga prevalens och de ekonomiska förluster som följer med sjukdomen. En nyligen publicerad studie visar att upp till 60 procent av dagens alla hältproblem är relaterade till OA (Frisbie, 2005). Ledsjukdomen drabbar alla ledens strukturer och kan utvecklas till ledsvikt, som för drabbade hästar innebär slutet på tävlingskarriären (Ferris *et al.*, 2011). Det är viktigt att förstå synovialledens anatomi och patofysiologin bakom OA för att kunna sätta in adekvat behandling (Goodrich & Nixon, 2006).

Det artikulära brosket har sämre förmåga att regenerera hos en vuxen individ (McIlwraith *et al.*, 2015). Den reparationsvävnad som bildas vid en broskskada består till största delen av fibröst brosk som saknar den funktion som artikulärt brosk normalt sett har (Abu-Seida Ashraf, 2015). För närvarande finns det ingen läkemedelsbehandling som kan hämma progressionen av OA (Ortved & Nixon, 2015). Det finns inte heller någon känd behandling som kan bota OA så att leden återfår full funktion (Koch & Betts, 2007).

Inom veterinärmedicin har biologiska behandlingsmetoder väckt stort kliniskt intresse den senaste tiden eftersom de baseras på individens naturliga förmåga att läka och den potentiella regenerativa förmåga de besitter (Monteiro *et al.*, 2015). Regenerativa terapier är ett område som växer fort, både experimentellt och kliniskt. Stamceller utgör en lovande strategi för att kunna regenerera skadade vävnader genom att de kan differentiera ut till olika celltyper med rätt stimulering. Mesenkymala stamceller (MSC) har stor potential att i framtiden vara en effektiv terapiform vid OA eftersom MSCs kan differentiera ut till kondrocyter som kan producera broskspecifika komponenter (Spaas *et al.*, 2012). Målet är att återställa ledytan och förhindra vidare broskdegeneration (Ortved & Nixon, 2015).

Syftet med det här arbetet är att sammanställa de vetenskapliga studier som idag finns publicerade där OA hos häst har behandlats med MSCs. I arbetet granskas både experimentella och kliniska försök, främst på häst men även studier andra modelldjur har inkluderats. Inledningsvis kommer synovialledens anatomi och patofysiologin bakom OA att beskrivas, som bakgrundsmaterial till kapitlet om behandling med stamceller.

MATERIAL OCH METODER

Vid litteratursökningen användes sökorden (stem cells OR MSC OR biologic treatment OR cell therapy) AND (osteoarthritis OR OA OR joint disease) AND (horse OR equine). Sökningen involverade en kombination av ovanstående sökord samt sökningar utan (horse OR equine) för att visa studier med andra modelldjur än häst. Vid sökningen användes databaserna PubMed, Scopus och Web of Science.

Förutom artiklar från dessa databaser användes E-böcker som bakgrundsmaterial, framförallt boken *Joint Disease in the Horse* skriven av McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C. & van Weeren, R. (2015).

LITTERATURÖVERSIKT

Synovialleden

I det här arbetet kommer bara synovialleder att behandlas, det vill säga de leder som är helt rörliga. Synovialleder är så kallade äkta leder där en ledhåla skiljer de två ledytorna åt. Synovialleder förekommer främst i extremiteterna och de återfinns bland annat i kot-, knä-, kron- och hovled. Vid hälta är det framförallt synoviallederna som är drabbade (McIlwraith *et al.*, 2015).

Funktion

Ledens funktion är att möjliggöra rörelse och fördela belastningen över hela ledens yta. Det gör att leden får bra stötdämpning och absorption av det tryck som uppstår vid rörelse. Stötdämpningen som fås i leden är beroende av både ben och mjuk vävnad, såsom brosk och ligament (Baxter, 2011).

Anatomi

En synovialled består av en ledkapsel med en yttre fibrös del samt ett synovialmembran som täcker kapselns insida, en ledhåla med ledvätska, hyalint brosk, subkondralt ben samt senor och ligament (Skiöldebrand, 2004). Leden anses vara ett komplext organ där de ingående strukturerna samverkar för att upprätthålla ledens funktion (McIlwraith *et al.*, 2015).

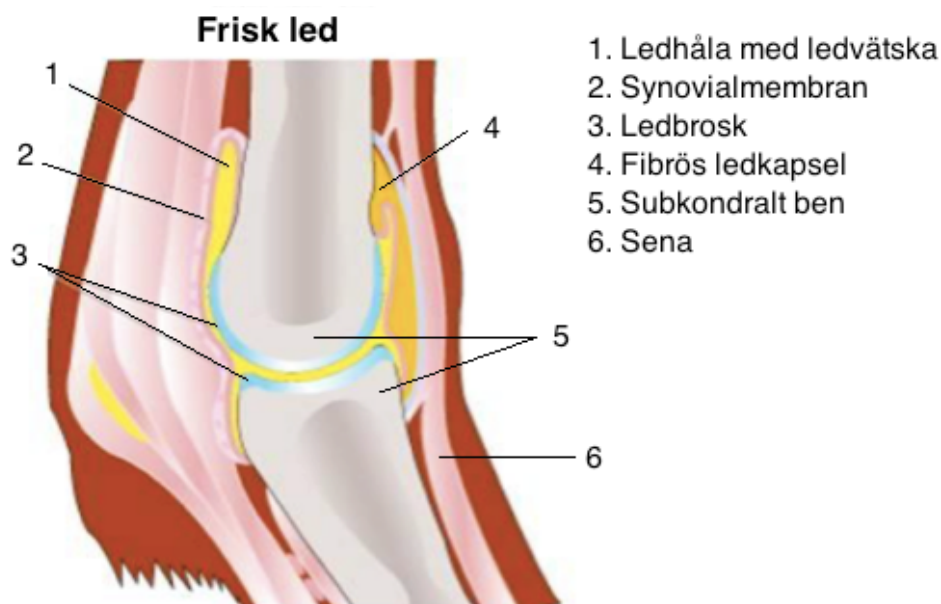


Bild 1. Ledens uppbyggnad (modifierad bild från Li Gessbo 2004).

Ledkapsel

Ledkapseln består av två delar: en yttre fibrös kapsel samt ett synovialmembran (ledhinna) som är placerad in mot ledhålan (Baxter, 2011).

Den yttre kapseln utgörs av ett bindvävslager. Denna vävnad är väl integrerad till extraartikulära strukturer som kollateralligament. Den fibrösa kapselns funktion är att ge mekanisk stabilitet till leden. Dessutom inrymmer den yttre ledkapseln nervändar som förser hjärnan med information om ledens position (McIlwraith *et al.*, 2015).

Synovialmembranet har två lager: det intima och det subintima. Det subintima lagret består av bindväv och är rikt vaskulariserad och innerverad (McIlwraith *et al.*, 2015).

Det intima lagret som tangerar ledhålan består av synoviocyter arrangerade i ett tunt skikt. Typ B synoviocyter är sekretoriska celler som tillverkar hyaluronsyra och kollagen (komponenter i ledvätskan) medan typ A är vävnadsmakrofager (Ley *et al.*, 2008). Det intima lagret saknar basalmembran och angränsar till ett stort antal blodkärl. Detta möjliggör passage av komponenter från blodplasman över till ledvätskan. Alla små molekyler passerar fritt till och från plasman till ledvätskan medan de större molekylerna i ledvätskan måste sekreteras aktivt av synoviocyterna (McIlwraith *et al.*, 2015).

Ledvätska

Ledvätskan innehåller hyaluronsyra, socker, elektrolyter och enzymer (König & Liebich, 2007). Andelen celler i ledvätskan är liten och det förekommer bara ett mindre antal lymfocyter och andra benmärgsderiverade mononukleära celler (McIlwraith *et al.*, 2015).

Ledvätskan har flera viktiga uppgifter. Friktionen i leden vid rörelse reduceras genom att ledvätskan verkar smörjande (König & Liebich, 2007). Tack vare hyaluronsyran, som produceras av synoviocyterna, blir ledvätskan viskös vilket ger leden en stötdämpande funktion vid rörelse (McIlwraith *et al.*, 2015).

En annan viktig uppgift är att möjliggöra näringsförsörjningen till ledbrasket eftersom brosket saknar egen blodförsörjning. Utbytet mellan plasman och ledvätskan tillgodoser brosket med nödvändig näring och avlägsnar slaggprodukter. Utbytet styrs av hydrostatiska och kolloidosmotiska tryckskillnader mellan plasma och ledvätska (McIlwraith *et al.*, 2015).

Ledbrosk

I synovialleder är ledbrasket av hyalin typ som är en högt specialiserad vävnad. Brosket består av kondrocyter och extracellulärt matrix som bildas av kondrocyterna. Ledbroskets uppgift är att verka stötdämpande och tryckfördelande vid belastning samt att tillhandahålla låg friktion (McIlwraith *et al.*, 2015).

Kondrocyter

Celltätheten i det vuxna brosket är väldigt låg och kondrocyterna är den enda celltypen i brosket. Kondrocyterna producerar alla molekyler som förekommer i det extracellulära matrixet. Till skillnad från celler i andra vävnader verkar inte kondrocyterna stå i kontakt med varandra, troligtvis på grund av det stora intercellulära avståndet (McIlwraith *et al.*, 2015).

Kondrocyterna är lokaliserade i fyra zoner i brosket. Den ytliga zonen angränsar till ledhålan och det förekommer rikligt med kollagen och vatten. Tredje zonen har riklig förekomst av aggrecan och kondrocyterna är ordnade i lodräta rader. Den kalcifierad broskzonen består av degenererade kondrocyter som har mineraliserats och förkalkats (McIlwraith *et al.*, 2015).

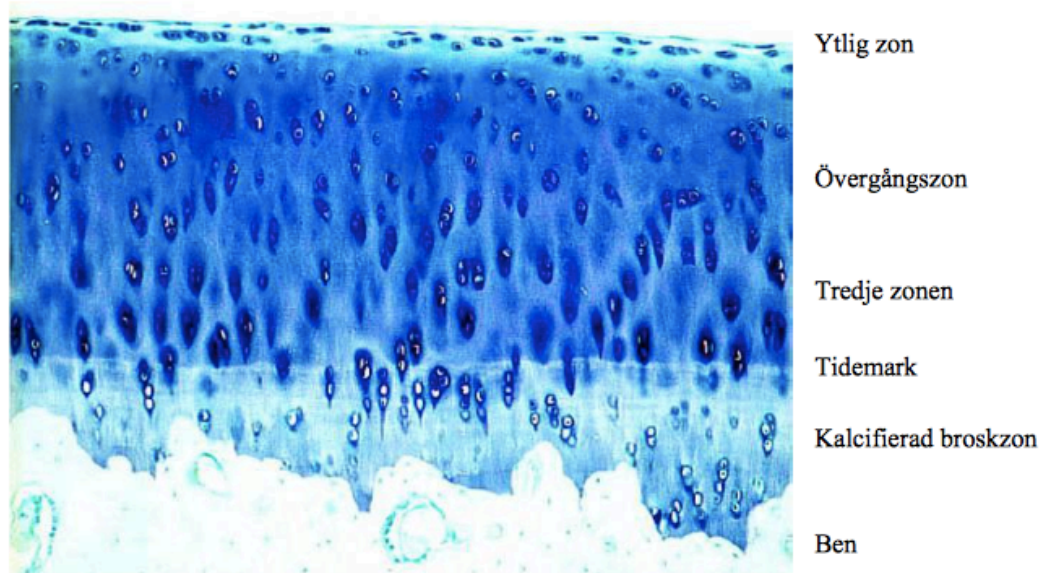


Bild 2. Ledbroskets zoner (Eva Skiöldebrand 2004).

Extracellulärt matrix

Det extracellulära matrixet (ECM) består framförallt av vatten, kollagen, proteoglykaner och icke-kollagena proteiner (McIlwraith *et al.*, 2015).

De kollagena fibrerna är de huvudsakliga proteinerna i ECM och ger brosket en hög draghållfasthet. Kondrocyterna syntetiserar kollagen typ II, vilka bildar långa kedjor bestående av tre fibriller som tillsammans bildar en trippelhelix. Ett nätverk bildas genom att flera kollagenfibrer binder till varandra. Kollagenet har flera viktiga molekyler till sin hjälp när detta nätverk ska bildas, bland annat en molekyl som heter Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) som kan binda in fem kollagen typ II molekyler. Nätverket sträcker sig genom hela ledbrosket och ger stadga (McIlwraith *et al.*, 2015).

Näst efter vatten och kollagen utgör proteoglykaner den största delen av ECM. Proteoglykanaggregaten ligger insprängda mellan kollagenfibrillerna och de binder in till hyaluronmolekyler. De är uppbyggda av ett kärnprotein med många sidokedjor av glykosaminoglykaner (GAGs) som har bundit in radiellt till kärnproteinet. GAGs är långa kedjor uppbyggda av negativt laddade molekyler som, genom att de repellerar varandra, sträcker ut sig i brosket. De hydrofila sidokedjorna drar till sig vattenmolekyler, vilka lägger sig mellan kedjorna. Vattnet pressas ut vid belastning av leden och dras tillbaka in i matrix när leden är i vila. Därför sägs det att artikulärt brosk är en viskoelastisk vävnad (McIlwraith *et al.*, 2015).

Aggrekan är den proteoglykan som förekommer i störst utsträckning i ledbrosk. Aggrekan har två olika GAGs bundna till sitt protein: kondroitinsulfat och keratansulfat. Dessutom har aggrekanmolekylen tre globulära domäner: G1, G2 och G3. Aggrekanmolekylen bildas av kondrocyterna och väl ute i matrixet binder de till hyaluronsyra via ett länkprotein (McIlwraith *et al.*, 2015). Hyaluronsyra bildas av ett enzym i cellmembranet och utsöndras sedan till det extracellulära matrixet (Roughley, 2006). Vid sjukdom eller ålder kan aggrekanmolekylen förlora flera delar av molekylen (McIlwraith *et al.*, 2015).

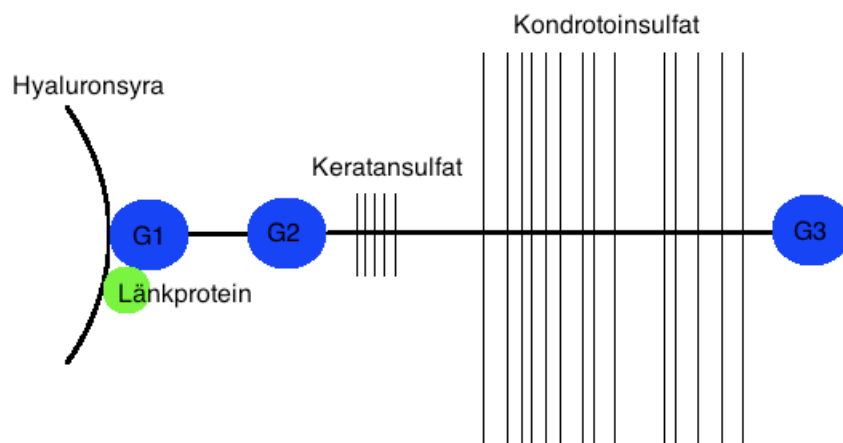
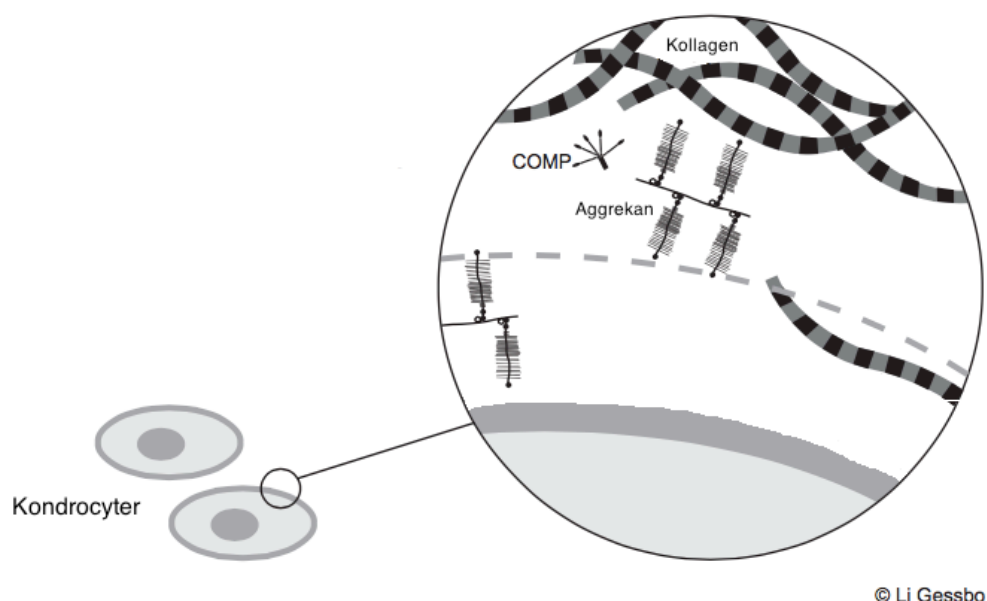


Bild 3. Aggrekanmolekylens uppbyggnad (modifierad bild från Elin och Oscar Dahllöv).

Icke-kollagena proteiner är exempelvis länkproteiner som är ansvariga för att binda samman och stabilisera aggregat av aggrekan och hyaluronsyra. Även COMP är ett icke-kollagent protein (Thur *et al.*, 2001).



© Li Gessbo

Bild 4. Extracellulärt matrix (modifierad bild från Li Gessbo 2004).

Subkondralt ben

Den kalcifierade broskzonen sammanbinder det hyalina brosket med det subkondrala benet. Det subkondrala benet är rikligt vaskulariserat med hög metabolism. Det pågår hela tiden en aktiv process i benet genom att nya osteoblaster bildas samtidigt som osteoklasterna bryter ner benet. Genom dessa processer kan benet anpassas till den belastning det utsätts för. Hos hästar som tränas hårt kan det subkondrala benet förtjockas och skleros kan ses på röntgen. Benet blir då stumt och risken för mikrofrakturer ökar. Skleros av det subkondrala benet tros vara en initierande faktor vid utveckling av OA (McIlwraith *et al.*, 2015).

Senor och ligament

Senor och ligament är mjukvävnad som, tillsammans med muskler, verkar som förstärkning och ger mekanisk stabilitet till stukturerna i leden. Med avseende på struktur och biomekanik liknar senor och ligament den fibrösa ledkapseln. Dessa vävnader är hypocellulära och utgörs till största delen av ECM bestående av kollagen, proteoglykan, GAGs och vatten (McIlwraith *et al.*, 2015).

Osteoartrit

OA är en kronisk progressiv inflammatorisk ledsjukdom där alla ledens strukturer är drabbade. De destruerande processerna försämrar ledens funktion och det kan slutligen leda till ledsvikt (McIlwraith *et al.*, 2015).

Etiologi

Etiologin vid OA kan vara ett akut trauma, exempelvis fraktur eller slag. Den vanligaste orsaken är dock att leden felbelastas upprepade gånger vid träning, vilket kan leda till att små trauman uppstår på leden och en inflammation startar i en eller flera strukturer som leder till en ökad nedbrytning av broskmatrix (Skiöldebrand, 2004).

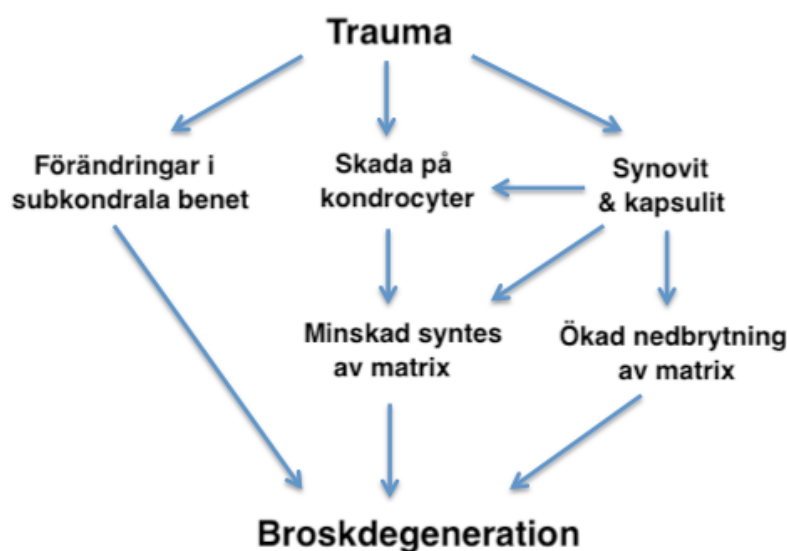


Bild 5. Hur trauma leder till broskdegeneration (modifierad bild från Kidd *et al.*, 2001).

Patogenes

I en frisk led har man en balans mellan de nedbrytande och uppbyggande processerna i ledvävnaden. I tidigt skede av OA ökar den katabola metabolismen vilket gör att vävnaderna bryts ner. Om sjukdomen har fortgått en tid blir förändringarna irreversibla. Därför är det viktigt att i ett så tidigt skede som möjligt ställa diagnos och påbörja adekvat behandling (Skiöldebrand, 2004).

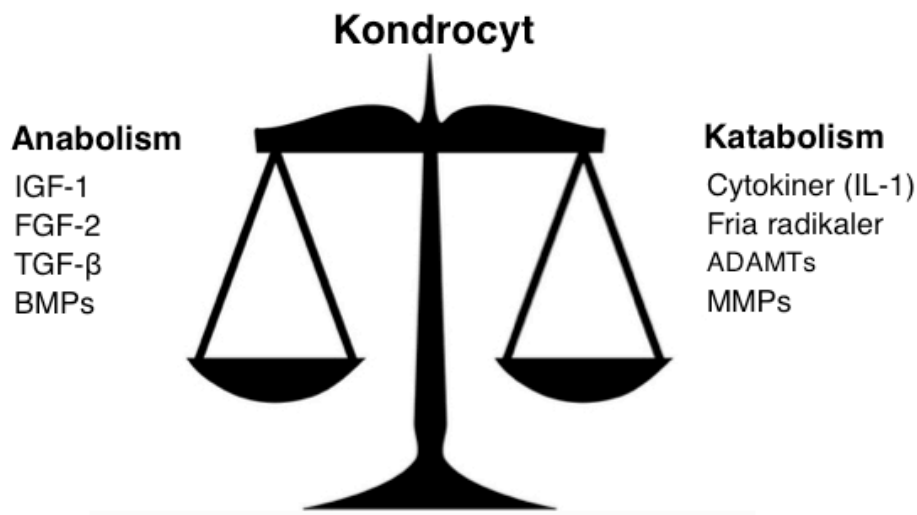


Bild 6. Vid OA är det obalans mellan kondrocytens anabola och katabola processer (egen bild 2016).

Inflammation

Ofta startar OA med en synovit eller en kapsulit. Inflammationen leder till att neutrofiler, makrofager och leukocyter migrerar till inflammationsplatsen. Proinflammatoriska cytokiner, som interleukin-1 (IL-1), frisätts vilka inhiberar syntesen och inducerar nedbrytning av kollagen och proteoglykaner (McIlwraith *et al.*, 2015).

Interleukin-1

Den proinflammatoriska cytokinen IL-1 har en avgörande roll i sjukdomsutvecklingen. IL-1 syntetiseras och frisätts av synoviocyter i ledkapseln och av kondrocyter i ledbrösket. IL-1 stimulerar, i inflammerade leder, synoviocyterna och kondrocyterna till produktion och frisättning av prostaglandin E₂ (PGE₂), metalloproteinaser (MMPs) och aggregkanaser (ADAMTs) (McIlwraith *et al.*, 2015).

PGE₂

PGE₂ är en proinflammatorisk mediator och frisättning leder till att koncentrationen proteoglykaner minskar både genom att nedbrytningen av proteoglykaner ökar och genom att syntesen minskar (McIlwraith *et al.*, 2015).

MMPs

MMPs är proinflammatoriska enzymer som frisätts av synoviocyter och kondrocyter vid OA. De är ansvariga för att bryta ner proteoglykaner, kollagen och andra matrixkomponenter (Nesic *et al.*, 2006).

I tidigt skede av broskdegenerationen bryter MMPs ner proteoglykaner vilket ger en ökad vävnadsvolym (Skiöldebrand, 2004). Matrixet tappar sin vätskebindande förmåga och vävnaden förlorar funktion (Nesic *et al.*, 2006). När proteoglykannivåerna i brosket har nått en särskild gräns startar degraderingen av kollagennätverket. Då ses en svullnad av vävnaderna och leden blir mindre flexibel och tånjbar (McIlwraith *et al.*, 2015).

MMPs inhiberas av tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) som finns i bindväven. I en frisk led ses ett överskott av TIMP medan det vid en ledskada ses högre koncentration av MMPs. I en normal led hjälper MMPs till att upprätthålla en korrekt homeostas men vid OA uppregleras MMPs (McIlwraith *et al.*, 2015).

ADAMTs

Aggrekanaserna (ADAMTs) är även de proinflammatoriska enzymer som specifikt klyver och bryter ner aggrekan. Deras uttryck uppregleras vid OA och det är framförallt ADAM-TS-4 och ADAM-TS-5 som är ansvariga för att bryta ner aggrekanmolekylen (Nesic *et al.*, 2006).

Fria radikaler

Fria radikaler spelar en viktig roll i sjukdomsutvecklingen genom att de klyver och bryter ner proteoglykaner, hyaluronsyra och kollagen. Superoxidanjoner, hydroxylradikaler och hydrogenperoxider bildas av synoviocyter i ledkapseln vid inflammation (McIlwraith *et al.*, 2015).

Tillväxtfaktorer

Kondrocyterna syntetiserar tillväxtfaktorer (Skiöldebrand, 2004), exempelvis TGF- β (transforming growth factor beta) som nedreglerar matrixnedbrytande enzymer samtidigt som syntesen av kollagen typ II och aggrekan stimuleras. TGF- β motverkar alltså nedbrytningen av broskmatrixet som inducerats av IL-1. Med stigande ålder reduceras effekten av TGF- β (McIlwraith *et al.*, 2015).

En annan viktig tillväxtfaktor är IGF-1 (insulin-like growth factor 1). IGF-1 spelar en avgörande roll för broskets homeostas. IGF-1 skyddar brosket mot IL-1s katabola effekter genom att uppreglera antalet lösliga IL-1 receptorer. Färre IL-1 molekyler kommer då finnas tillgängliga för att verka proinflammatoriskt (McIlwraith *et al.*, 2015).

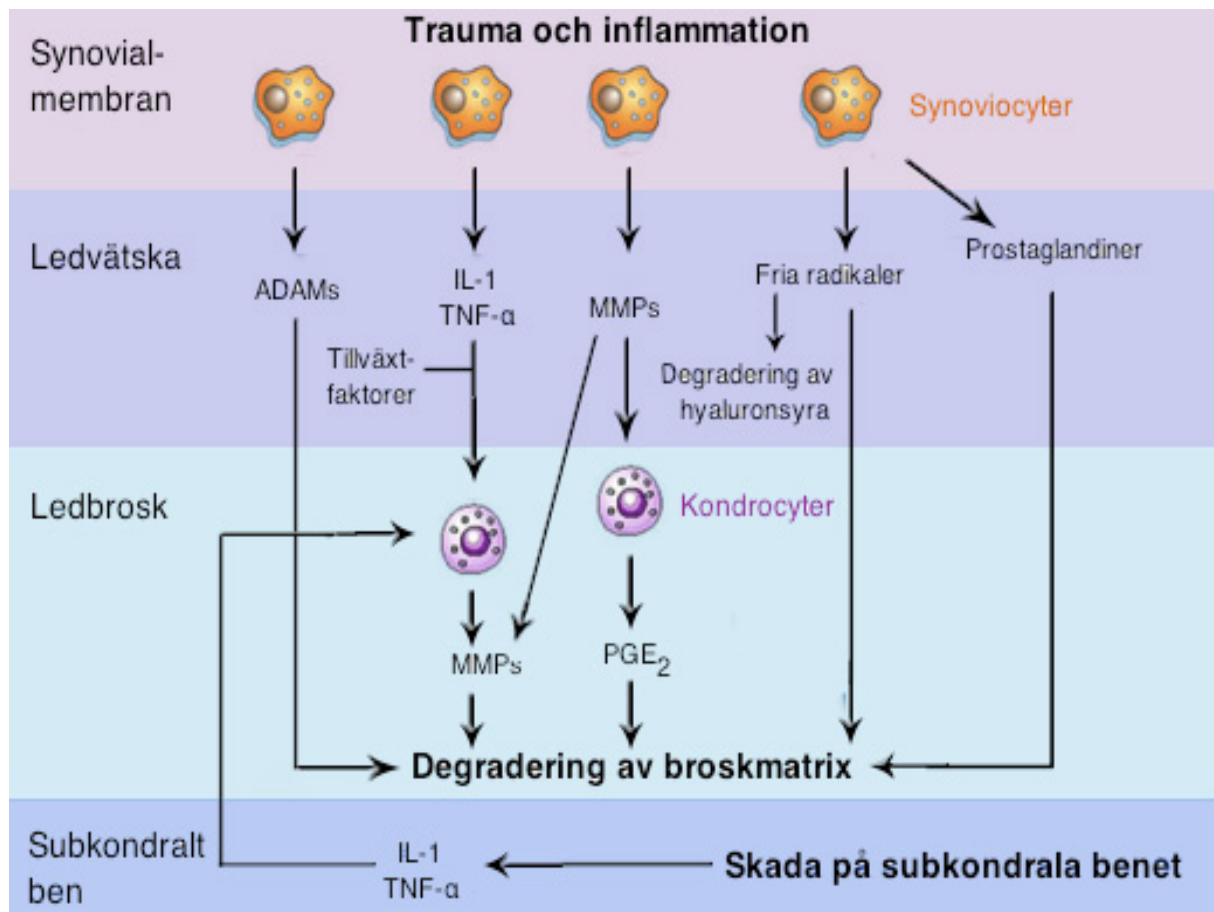


Bild 7. Processer i leden som leder till degradering av broskmatrix (egen bild 2016).

Kliniska och histologiska fynd

Avläkningen kännetecknas av att kondrocyterna genomgår en ändring i fenotyp och blir mer fibroblastlika. Kondrocyterna bildar kollagen typ I istället för typ II celler och versikan istället för aggrecan vilket gör vävnaden mer fibrös. Brosket blir känsligt för ytterligare tryck och nya skador uppstår lätt då brosket tappat sin elasticitet (Skiöldebrand, 2004).

Initialt i sjukdomsförloppet ses inte några kliniska symptom. I senare stadier ses hálta, svullnad, smärta och minskad rörlighet i leden (Skiöldebrand, 2004). Gallor uppstår eftersom mängden ledvätska ökar vid inflammationen. Anledningen till det är att permeabiliteten för blodkärlen ökar samt att lymfdränaget minskar (McIlwraith *et al.*, 2015).

De histologiska förändringar som kan ses i leden är degeneration av brosket, synovit och/eller kapsulit, subkondral skleros och/eller mikrofrakturer och ibland osteofyter (Skiöldebrand, 2004). Osteofyter kan uppstå då det subkondrala benet drabbas och på grund av den nya benbildning som då sker kan pålagringar bildas (McIlwraith *et al.*, 2015).

Behandling med stamceller

Mesenkymala stamceller

Stamceller karaktäriseras av att de har förmågan att hela tiden förnya sig själva samt att de kan differentiera ut till olika specialiserade celltyper (Taylor *et al.*, 2007). Bindvävsstamceller, även kallade mesenkymala stamceller (MSC), är adulta multipotenta stamceller som återfinns i benmärg, fettvävnad och navelsträng. MSC har förmågan att differentiera ut till ben-, brosk-, sen- och fettceller (Le Blanc, 2002).

Potentialen hos MSCs

Intresset för regenerativa behandlingsmetoder inom veterinärmedicinen ökar hela tiden. Stamceller utgör en lovande strategi för att kunna regenerera skadat brosk genom att cellerna kan differentiera ut till broskceller som producerar broskspecifika komponenter, exempelvis kollagen typ II och GAGs (Spaas *et al.*, 2012). Forskning riktas idag mot förhoppningen att i framtiden använda implantation av MSCs rutinmässigt vid broskdefekter. I experimentella djurförsök har det visat sig att stamceller kan öka läkningsförmågan (Frisbie, 2005).

Vid en ledskada utgör celler från benmärgen en viktig roll för reparationen av brosket (Le Blanc, 2002). Eftersom brosket hos den vuxna individen har begränsad förmåga att reparera sig själv vid en skada så studeras idag cellernas möjligheter att rekryteras till skadeplatsen (Vemuri *et al.*, 2011).

Antiinflammatoriska egenskaper

MSCs är immunomodulerande och kan reglera inflammation, till synes genom dess aktiva suppression av både det medfödda och förvärvade immunförsvaret. De har visat sig kunna reglera proliferationen och funktionen hos ett flertal olika immunförsvarsceller, bland annat B- och T-lymfocyter, NK-celler, neutrofiler och dendritiska celler (Whitworth & Banks, 2014). De kan även inhibera sekretionen av proinflammatoriska cytokiner (IL-1, TNF- α och IFN- γ) samtidigt som sekretionen av antiinflammatoriska interleukiner (bland annat IL-6) stimuleras. Genom stimulering av TIMP kan de även inhibera MMPs (Monteiro *et al.*, 2015).

Utvinning av MSCs

Vanligtvis används MSCs som är deriverade från antingen adult benmärg (BM-MSCs) eller fettvävnad. När det gäller behandling av OA har benmärgsderivade stamceller visat sig vara mest gynnsamma, både i experimentella och kliniska studier. En annan källa till MSCs som har använts på häst är stamceller deriverade från perifert blod (Schnabel *et al.*, 2013).

Antingen kan enbart BM-MSCs injiceras in i leden eller i en kombination med traditionella behandlingsformer (Schnabel *et al.*, 2013). Studier där MSCs odlas ut i en matrix visar mer lovande resultat, eftersom cellerna växer tredimensionellt och mognar ut bättre än i en lösning. En kombination av att cellerna växer i ett biomaterial, som hyaluronsyra, i mediet har visat sig stödja kondrogensen (Taylor *et al.*, 2007).

Differentiering och adhering

MSCs kan stimuleras till att differentiera längs en specifik väg genom att specifika faktorer tillsätts under odlingen. *In vitro* får de mesenkymala stamcellerna genomgå en broskdifferentiering genom kultivering i ett serumfritt medium innehållande bland annat growth factor- β 3 (TGF- β 3). Att styra differentieringen av stamceller är inte en enkel process och många olika tillväxtfaktorer är inblandade (Taylor *et al.*, 2007).

För att få ett lyckat resultat av implanteringen av stamceller i brosk gäller det att stamcellerna differentierar ut till kondrocyter och bildar broskmatrix. Ofta differentierar stamcellerna ut och blir benceller vilket ger ett oönskat resultat (Taylor *et al.*, 2007).

MSCs utgör endast 0,001-0,01 procent av de kärnförsedda cellerna i benmärgen och i många fall behövs en större andel stamceller än vad som erhålles vid dessa kliniska aspirationer (Taylor *et al.*, 2007). Efter 3-4 veckor av odling har ett tillräckligt stort antal MSCs uppnåtts (Ortved & Nixon, 2015).

Vissa studier har visat att MSCs har förmåga att adherera och växa in i ledbrosket. Vid andra studier har dock införlivandet av stamcellerna i det artikulära brosket misslyckats (Monteiro *et al.*, 2015), eftersom MSCs föredrar att växa i mjukvävnaderna i leden framför brosket (Frisbie & Stewart, 2011). Många av de positiva effekter som idag har sett vid behandling med MSCs är ett resultat av stamcellernas antiinflammatoriska egenskaper snarare än de regenerativa. Tack vare att inflammationen reduceras vid OA, minskar graden av broskdestruktion, osteofytbildning och skleros i det subkondrala benet. Om integreringen av cellerna till ledbrosket misslyckas, kan det antas att de positiva effekter som ses beror på stamcellernas antiinflammatoriska egenskaper. De antiinflammatoriska egenskaperna ger bara kortlivade effekter till skillnad från de regenerativa som verkar även på lång sikt (Monteiro *et al.*, 2015).

Studier med MSC

Experimentella studier

2007 publicerades den första experimentella studien på häst med MSCs. En akut ledskada inducerades, varefter BM-MSCs implanterades med autogent fibrin i det ena benet på hästen och i motstående ben implanterades bara autogent fibrin. Vid artroskopi 30 dagar senare visade det att skadorna i leden som behandlats med BM-MSCs hade läkt betydligt bättre än kontrolden skada. Efter 8 månader däremot sågs ingen större skillnad mellan de histologiska och biokemiska resultaten i de respektive lederna (Fortier & Travis, 2011). Resultaten kan förklaras av att det var stamcellernas antiinflammatoriska effekter som sågs efter 30 dagar. Eftersom de effekterna är kortlivade så kan de ha avtagit till den tidpunkt då den andra kontrollen gjordes (Monteiro *et al.*, 2015). En annan förklaring till resultaten kan vara förlust av stamceller eller att stamcellerna inte differentierade ut till broskceller (Wilke *et al.*, 2007).

I ett annat försök från 2009 studerades intraartikulärt injicerade stamceller för behandling av OA hos häst. En ledskada inducerades och hästarna behandlades med kultiverade BM-MSCs, stamceller från fettvävnad eller saltlösning som kontroll. I de leder som behandlades med BM-MSCs sågs lägre koncentrationer av den proinflammatoriska mediatorn prostaglandin E₂ samt att den synoviala effusionen var mindre. En större studie krävs för att avgöra hur BM-MSCs påverkar leden vid en naturligt förekommande osteoartrit. Det är möjligt att de mesenkymala stamcellerna skulle ha en ännu större positiv effekt hos hästar med längre framskriden OA, än i de observerade effekterna vid experimentella modeller (Fortier & Travis, 2011).

Studier med andra modelldjur

2003 publicerades en studie med get som modelldjur. 15 getter ingick i behandlingsgruppen och 9 getter i kontrollgruppen. Adulta stamceller isolerades från benmärg från get och behandlingsgruppen injicerades med stamcellerna medan kontrollgruppen injicerades med hyaluronsyra. De implanterade cellerna detekterades i den nybildade vävnaden. I de cellbehandlade lederna sågs dessutom en reducering i broskdegenerationen, minskad osteofytbildning och minskad skleros i det subkondrala benet jämfört med kontrollgruppen. Reparationsvävnaden i behandlingsgruppen uppvisade organisering medan kontrollgruppens reparationsvävnad var oorganiserad. Resultaten mellan behandlings- och kontrollgrupp var statistiskt skilda gällande det artikulära broskets struktur och skleros i subkondrala benet (Murphy *et al.*, 2003).

2011 gjordes en studie på apor. 27 apor delades in i tre grupper med 9 apor i varje grupp, med avseende på när i sjukdomsförloppet behandling påbörjades (3, 6 och 9 veckor efter inducering av OA). MSCs märktes med ett fluorescerande protein och injicerades tillsammans med hyaluronsyra i den ena karpalleden. Den andra karpalleden fungerade som kontroll och den injicerades bara med hyaluronsyra. I alla tre behandlingsgrupper sågs en statistisk signifikant förbättring, både kliniskt och radiologiskt, jämfört med kontrolleden. Fluorescensmikroskop indikerade att stamcellerna hade integrerats i det artikulära brosket, både på ytan och inne i brosket. Studien visade också att desto tidigare i sjukdomsförloppet injektionen med MSCs sker, desto mer fördelaktigt för en positiv utgång (Mokbel *et al.*, 2011).

När det gäller försök där människa behandlats med MSCs är det främst OA i knäleden som studerats. Pre-kliniska studier har visat på goda resultat och 2015 fanns det 14 pågående kliniska försök där människor med OA behandlades med MSCs (Wyles *et al.*, 2015). Precis som i flera av studierna med djurmodeller saknas i många av fallen kontrollgrupper. I en studie där 12 personer med OA i knäleden ingick, behandlades patienterna med MSCs intraartikulärt i närvaro av en kontrollgrupp där patienterna fick en cellfri behandling. Förbättringar hos behandlingsgruppen sågs både histologiskt och artroskopiskt men ingen signifikant skillnad sågs kliniskt (Kristjánsson & Honsawek, 2014). Andra studier har visat på resultat där knäet återfått funktion efter behandling och broskdefekterna har minskat genom regeneration av hyalinlikt ledbrosk (Jo *et al.*, 2014).

Kliniska försök

Antalet kliniska försök där behandling med MSCs studerats på naturligt uppkommen leddskada hos häst är få. Inga bieffekter har setts vid behandling med MSCs (Monteiro *et al.*, 2015).

I en studie som publicerades 2009 inkluderades 40 hästar med långt gången broskdegeneration och förlust av mjukvävnadsstrukturer i knäleden. De behandlades med MSCs och hyaluronsyra en månad efter diagnos. Vid uppföljningen som gjordes efter 21 månader hade 73 procent av hästarna (29 stycken) återgått till träning. Studien innehöll ingen kontrollgrupp (Ferris *et al.*, 2009).

2011 gjordes en studie där 33 hästar med OA i ett eller båda bakknäna injicerades intraartikulärt med BM-MSCs vid ett tillfälle. En uppföljning gjordes efter 24 månader och då hade 76 procent av hästarna återgått till arbete. Inte heller i denna studie fanns någon kontrollgrupp (Ferris *et al.*, 2014).

En mer omfattande studie gjordes 2014 där 165 hästar med OA i olika leder – knäled (n=30), kotled (n=58), karled (n=34) och hovled (n=43) – behandlades med antingen naiva MSCs eller kondrogent inducerade MSCs intraartikulärt. Redan efter 6 veckor hade 45 procent av hästarna som behandlats med naiva MSCs och 60 procent av hästarna som behandlats med kondrogent inducerade MSCs återgått till arbete. Efter 18 veckor var de positiva effekterna ännu större – 78 procent respektive 86 procent av de behandlade hästarna hade återgått till arbete (Broeckx *et al.*, 2014a).

Den första studien som gjorts då naturligt uppkommen OA behandlas med MSCs i närvaro av en kontrollgrupp publicerades 2014. I studien ingick 20 hästar indelade i fyra grupper med fem hästar i vardera grupp. Grupp 1 (kontrollgrupp) behandlades med platelet-rich plasma (PRP), grupp 2 med naiva MSCs, grupp 3 med naiva MSCs och PRP, grupp 4 med kondrogent inducerade MSCs och PRP. Hästarna som ingick i studien skulle ha visat symptom på mild till moderat osteoartrit i kotleden i minst 3 månader. Alla hästarna utvärderades och graderades kliniskt av två oberoende veterinärer med avseende på hálta, böjprovsreaktion och ledeffusion. Hästarna undersöktes sedan efter 6 veckor, 12 veckor, 6 månader och 12 månader, varvid samma bedömning och gradering gjordes av samma två veterinärer. Kombinerad av PRP och naiva MSCs visade en signifikant förbättring av funktion och hållbarhet av de skadade lederna jämfört med de leder som enbart behandlades med PRP. Störst förbättring sågs hos de hästar som mottog PRP i kombination med kondrogen inducerade MSCs. Två av de fem hästarna i grupp 4 var redan efter 6 veckor helt friska och förblev friska genom hela studien. Vid kontrollen 12 månader efter behandlingen var fyra av fem hästar i grupp 4 friska och redo att återgå till arbete (Broeckx *et al.*, 2014b).

DISKUSSION

Anledningen till att så mycket forskning görs på mesenkymala stamceller är cellernas förmåga att differentiera ut till broskceller som kan producera ny broskvävnad. På så sätt kan cellerna ersätta skadad eller sjuk vävnad. MSC kan ha stor potential att revolutionera behandlingen av ortopediska sjukdomar hos häst i framtiden (Taylor *et al.*, 2007).

Ett flertal kommersiella företag runt om i världen erbjuder stamcellspreparat som regenerativ terapi vid OA hos häst och hund. Det är dock möjligt att denna kommersialisering har skett för tidigt med tanke på det begränsade antal resultat och studier som än så länge finns tillgängliga inom veterinärmedicin (Whitworth & Banks, 2014).

Fler studier som visar på långtidseffekter av BM-MSCs vid OA *in vivo* krävs för att ytterligare kunna demonstrera hur brosket regenererar genom behandlingen (Fortier & Travis, 2011). I dagsläget har främst kortvariga effekter kunnat ses vid injektion med MSCs på grund av problemet att integrera stamcellerna i ledbrösket. Fortsatta studier kring integrering av MSCs i brosket är nödvändiga för att studera de långvariga effekterna av reparation och regeneration av ledbrösket med MSCs (Whitworth & Banks, 2014).

Det råder blandade åsikter om när i sjukdomsförloppet det är mest optimalt att sätta in behandling. Vissa menar att injektion med MSCs inte ska ske i en akut traumatiserad led där vävnaden är inflammerad (Monteiro *et al.*, 2015) medan andra menar att behandlingen med fördel ska ske i tidigt skede av sjukdomen, innan fibrös ärrvävnad har hunnit bildas (Schnabel *et al.*, 2013). Man kan också tänka sig att de antiinflammatoriska egenskaper som setts hos MSCs, skulle vara fördelaktiga i den akuta fasen av sjukdomen då man har en inflammation (Monteiro *et al.*, 2015).

Bättre resultat efter behandling har setts vid kliniska försök än vid experimentella studier. Det kan bero på att experimentellt inducerad OA inte helt och hållet efterliknar naturligt uppkommen OA. Stamcellerna får då inte samma förutsättningar till differentiering, vilket skulle kunna förklara varför man inte sett samma kliniska förbättringar vid experimentella studier som har setts vid kliniska försök på naturliga ledsador (Broeckx *et al.*, 2014b).

Mer forskning krävs innan stamceller kan användas som terapi i kliniken. De studier som finns publicerade har visat väldigt varierande resultat och många frågetecken kvarstår att besvara. Problemet med många av de studier som är gjorda är att de saknar kontrollgrupper vilket gör det svårt att utvärdera resultaten som ses vid behandling med MSCs. Visa studier har visat sig mer lovande än andra men de flesta forskare är övertygade om att mesenkymala stamceller har stor potential som terapiform i framtiden.

REFERENSLISTA

- Abu-Seida Ashraf, M. (2015). Regenerative Therapy for Equine Osteoarthritis: A Concise Review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*.
- Baxter, G.M. (2011). Adams & Stashak's Lameness in Horses. 6 uppl.
- Broeckx, S., Suls, M., Beerts, C., Vandenberghe, A., Seys, B., Wuertz-Kozak, K., Duchateau, L. & Spaas, J.H. (2014a). Allogenic mesenchymal stem cells as a treatment for equine degenerative joint disease: a pilot study. *Curr Stem Cell Res Ther*, 9(6), ss. 497-503.
- Broeckx, S., Zimmerman, M., Crocetti, S., Suls, M., Marien, T., Ferguson, S.J., Chiers, K., Duchateau, L., Franco-Obregon, A., Wuertz, K. & Spaas, J.H. (2014b). Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PLoS One*, 9(1), s. e85917.
- Ferris, D.J., Frisbie, D.D., Kisiday, J.D., McIlwraith, C.W., Hague, B.A., Major, M.D., Zubrod, C.J., Kawcak, C.E. & Goodrich, L.R. (2014). Clinical Outcome After Intra-Articular Administration of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells in 33 Horses With Stifle Injury *Veterinary Surgery*.
- Ferris, D.J., Frisbie, D.D., McIlwraith, C.W., Hague, B.A., Major, M.D., Schneider, R.K., Zubrod, C.J., Watkins, J.J., Kawcak, C.E. & Goodrich, L.R. (2009). Clinical Follow-Up of Horses Treated With Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Musculoskeletal Lesions. *American Association of Equine Practitioners*.
- Ferris, D.J., Frisbie, D.D., McIlwraith, C.W. & Kawcak, C.E. (2011). Current joint therapy usage in equine practice: a survey of veterinarians 2009. *Equine Vet J*, 43, ss. 530-5.
- Fortier, L.A. & Travis, A.J. (2011). Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Res Ther*, 2(1), s. 9.
- Frisbie, D.D. (2005). Future directions in treatment of joint disease in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 21(1), ss. 713-724
- Frisbie, D.D. & Stewart, M.C. (2011). Cell-based therapies for equine joint disease. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 27, ss. 335-49.
- Goodrich, L.R. & Nixon, A.J. (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J*, 171, ss. 51-69.
- Jo, C.H., Lee, Y.G., Shin, W.H., Kim, H., Chai, J.W., Jeong, E.C., Kim, J.E., Shim, H., Shin, J.S., Shin, I.S., Ra, J.C., Oh, S. & Yoon, K.S. (2014). Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Proof-of-Concept Clinical Trial. *Stem Cells*.
- Kidd, J.A., Fuller, C., Barr, A. R. S. (2001). Osteoarthritis in the horse *Equine Veterinary Education*, 13, ss. 160-168.
- Koch, T.G. & Betts, D.H. (2007). Stem cell therapy for joint problems using the horse as a clinically relevant animal model. *Expert Opin Biol Ther*, 7, ss. 1621-6.
- Kristjánsson, B. & Honsawek, S. (2014). Current Perspectives in Mesenchymal Stem Cell Therapies for Osteoarthritis. *Stem Cells International*, 2014.
- König, H.E. & Liebich, H.-G. (2007). *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals*. 6 uppl. Tyskland: Schattauer Verlag.
- Le Blanc, K. (2002). Mesenkymala stamceller. *Läkartidningen*, 99.
- Ley, C., Skiöldebrand, E. & Ekman, S. (2008). Leden och ledbrösket - komplicerade och känsliga strukturer *Equilibris*, 2, ss. 4-9.
- McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C. & van Weeren, R. (2015). *Joint Disease in the Horse*: Elsevier.

- Mokbel, A.N., El Tookhy, O.S., Shamaa, A.A., Rashed, L.A., Sabry, D. & El Sayed, A.M. (2011). Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC Musculoskelet Disord*, 12, s. 259.
- Monteiro, S.O., Bettencourt, E.V. & Lepage, O.M. (2015). Biologic Strategies for Intra-articular Treatment and Cartilage Repair. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35, ss. 175-190.
- Murphy, J.M., Fink, D.J., Hunziker, E.B. & Barry, F.P. (2003). Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 48, ss. 3464-74.
- Nesic, D., Whiteside, R., Brittberg, M., Wendt, D., Martin, I. & Mainil-Varlet, P. (2006). Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 58, ss. 300-22.
- Ortved, K.F. & Nixon, A.J. (2015). Cell-based cartilage repair strategies in the horse. *Vet J*.
- Roughley, P.J. (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater*, 12, ss. 92-101.
- Schnabel, L.V., Fortier, L.A., McIlwraith, C.W. & Nobert, K.M. (2013). Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when? *Vet J*, 197, ss. 570-7.
- Skiöldebrand, E. (2004). Studies of articular cartilage macromolecules in the equine middle carpal joint, in joint pathology and training. Diss. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Spaas, J.H., Oosterlinck, M., Broeckx, S., Dumoulin, M., Saunders, J., Van Soom, A., Pile, F. & Van de Walle, G.R. (2012). Treatment of equine degenerative joint disease with autologous peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: a case report. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 81.
- Taylor, S.E., Smith, R.K. & Clegg, P.D. (2007). Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J*, 39, ss. 172-80.
- Thur, J., Rosenberg, K., Nitsche, D.P., Pihlajamaa, T., Ala-Kokko, L., Heinegard, D., Paulsson, M. & Maurer, P. (2001). Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J Biol Chem*, 276, ss. 6083-92.
- Vemuri, M.C., Chase, L.G. & Rao, M.S. (2011). Mesenchymal stem cell assays and applications. *Methods Mol Biol*, 698, ss. 3-8.
- Whitworth, D.J. & Banks, T.A. (2014). Stem cell therapies for treating osteoarthritis: prescient or premature? *Vet J*, 202(3), ss. 416-24.
- Wilke, M.M., Nydam, D.V. & Nixon, A.J. (2007). Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res*, 25(7), ss. 913-25.
- Wyles, C.C., Houdek, M.T., Behfar, A. & Sierra, R.J. (2015). Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*.